

## PREPARATION OF VALIENAMINE

(Publication No.)

Patent number:

JP57054593

→ JP-A-57-054593

Publication date:

1982-04-01

Inventor:

KAMEDA YUKIHIKO; others: 01

Applicant:

TAKEDA CHEM IND LTD

Classification:

- international:

C12P13/00

- european:

Application number:

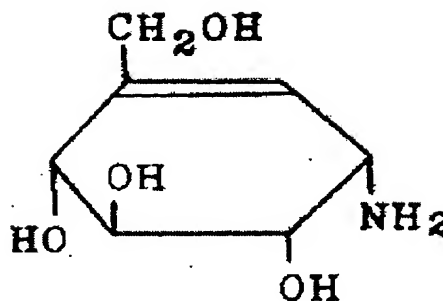
JP19800128157 19800916

Priority number(s):

## Abstract of JP57054593

**PURPOSE:** To prepare valienamine efficiently, by treating validamycin or validoxylamine with a bacterium belonging to the genus "Flavobacterium" or a substance obtained by treating it.

**CONSTITUTION:** A bacterium belonging to the genus "Flavobacterium", capable of producing an enzyme to form valienamine by its action on validamycin or validoxylamine or a substance obtained by treating the bacterium, e.g., "Flavobacterium saccharophilum" FERM-P 5707 is made to act on validamycin or validoxylamine, to give valienamine shown by the formula. Properly the concentration of the raw material compound in the reaction mixture is 1-5wt%, the reaction temperature is 20-45 deg.C, and pH is 5-8. Preferably the reaction time is 24-200hr and shaking or stirring is carried out.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Best Available Copy

## ⑫ 特許公報(B2) 平2-2589

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>  
 C 12 P 13/00  
 //(C 12 P 13/00  
 C 12 R 1:20)

識別記号

庁内整理番号  
 7236-4B

⑭ 公告 平成2年(1990)1月18日

発明の数 1 (全3頁)

⑬ 発明の名称 バリエナミンの製造法

⑯ 特 願 昭55-128157

⑰ 公 開 昭57-54593

⑱ 出 願 昭55(1980)9月16日

⑲ 昭57(1982)4月1日

⑳ 発 明 者 亀 田 幸 彦 石川県金沢市田上2丁目24番地

㉑ 発 明 者 堀 井 聡 大阪府堺市三原台3丁目32番1号

㉒ 出 願 人 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目3番6号

㉓ 代 理 人 弁理士 岩 田 弘

審 査 官 佐 伯 裕 子

微生物の受託番号 FERM P-5707

1

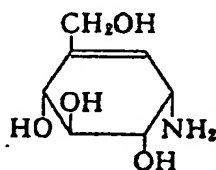
## ㉔ 特許請求の範囲

1 フラボバクテリウム属に属し、バリダマイシンまたはバリドキシルアミンに作用してバリエナミンを生成しうる酵素を産生する微生物またはその処理物を、バリダマイシンまたはバリドキシルアミンに作用させることを特徴とするバリエナミンの製造法。

## 発明の詳細な説明

本発明は、バリエナミンの製造法に関する。

本発明者らは先にバリダマイシンAまたはバリドキシルアミンAにシウドモナス・デニトリフィカンス(*Pseudomonas denitrificans*)の菌体を作用させることにより、下式で表わされる物質を自然界より初めて単離し、バリエナミンと命名し、報告した。〔亀田ら、ジャーナル・オブ・ザ・ケミカル・ソサイアティ；ケミカル・コミュニケーション(J.Chem.Soc.Chem.Commun.) 1972年、746頁〕



しかしながら、上記方法によるバリエナミンの生産は、本菌株がバリダマイシンAまたはバリド

2

キシルアミンAを直接資化せず、他の炭素源、例えばグルコースなどを含む培地で培養して得られる菌体を用いなければならず、またそのバリダマイシン分解能は微弱であり、バリエナミンの大量生産には適していない。

一方、本発明者らは、バリダマイシンを効率よく分解しうる菌を検索して、石川県金沢市の水田の土壌より、フラボバクテリウム(*Flavobacterium*)属の新菌株フラボバクテリウム・サツカロフィルム(*Flavobacterium saccharophilum* n.sp., IFO 13984)を発見単離し、1979年今井により新菌種として報告され(昭和54年度、日本醸酵工学会講演要旨集p242)ているが、この菌をはじめとして、フラボバクテリウム属には、バリダマイシンまたはバリドキシルアミンを好収率でバリエナミンに分解しうる菌が存在することを知見し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、フラボバクテリウム属に属し、バリダマイシンまたはバリドキシルアミンに作用してバリエナミンを生成しうる酵素を産生する微生物またはその処理物をバリダマイシンまたはバリドキシルアミンに作用させることを特徴とするバリエナミンの製造法である。

本発明方法に用いられるバリダマイシンは、農業用抗生物質として広く用いられており、その構造は、バリドキシルアミンとD-グルコースとか

3

ら成り立っている。バリドキシルアミンは現在AとBが知られており、そのバリドキシルアミンA、BとD-グルコースとの組み合わせによりバリダマイシンはA、B、C、D、E、Fとして存在することが知られている。

本発明方法においては、このような個々のバリダマイシン、バリドキシルアミンあるいはその混合物を原料として用いることができ、たとえばバリダマイシン生産菌の培養物あるいはその処理物が有利に用いられる。

本発明方法で用いられる微生物は、バリダマイシンまたは、バリドキシルアミンをバリエナミンに変換する能力を有するフラボバクテリウム属に属する微生物及びその変異株であればいずれでも良く、たとえば、フラボバクテリウム、サツカロフィルム (Flavobacterium saccharophilum, n.sp., IFO 13984, FERM-P Na5707) などが用いられる。このフラボバクテリウム・サツカロフィルムはグラム陰性、オキシダーゼ陽性、非運動性桿菌であり、バリダマイシンを唯一の炭素源としても、よく生育し糖を酸化的に分解する。そして単一炭素源として多種類の糖を利用するが、クレブスサイクルの中間体や糖アルコールを利用しない。また寒天平面の滑走は認められていない。(日本醸酵工学会大会、昭和54年11月7日、口頭発表、講演用旨集 242頁)

本発明の方法における上記の微生物の培養に用いられる培地は該菌株が利用し得る栄養源を含むものなら、液状でも固状でもよいが、大量を処理するときには液体培養を用いるのがより適当である。培地には上記の微生物が同化し得る炭素源、消化し得る窒素源、無機物質、微量栄養素等が適宜配合されてもよい。炭素源としては、たとえばブドウ糖、乳糖、シヨ糖、麦芽糖、デキストリン、でん粉、グリセロール、マンニトール、ソルビトール等、油脂類 (例、大豆油、ラード油、チキン油等) その他が、窒素源としては、たとえば肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、大豆粉、コーン、スチープ、リカー、ペプトン、棉実粉、蔗糖、尿素、アンモニウム塩類 (例、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等) その他が用いられる。さらにナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどを含む塩類、鉄、マンガン、亜鉛、コバル

4

ト、ニッケルなどの金属塩類、リン酸、ホウ酸などの塩類や酢酸、プロピオン酸などの有機酸の塩類が適宜用いられる。その他、アミノ酸、(例、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、グリシン、リジン、メチオニン、プロリン等)、ペプチド (例、ジペプチド、トリペプチド等)、ビタミン類 (例、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、ニコチン酸、B<sub>12</sub>、C、E等)、核酸類 (例、プリン、ピリミジンおよびその誘導体等) 等を含ませてもよい。もちろん培地のpHを調節する日的で無機または有機の酸、アルカリ類、緩衝剤等を加え、あるいは消泡の目的で油脂類、表面活性剤等の適量を添加してもよい。

培養の手段は静置培養でも、振盪培養あるいは通気攪拌培養法等の手段を用いてもよい。大量の処理には、いわゆる深部通気攪拌培養によるのが望ましいことはいうまでもない。培養の条件は培地の状態、組成、菌株の種類、培養の手段等によって一定しないのは当然であるが、それらは通常20℃～45℃の温度で初発pHを中性附近に選択するのがよい。とりわけ、培養中期の温度は24℃～37℃、また初発pHは6.5～8.5の条件が望ましい。培養時間は6～100時間程度で良いが、とくに16～60時間で良好である。

本発明で用いられる「培養物」とは、上記の培養で得られるものをいう。

本発明では、このようにして得られた菌体あるいはその処理物を用いることができ、ここに「処理物」とは、上記で得られる培養物を物理化学的処理たとえばろ過、遠心分離、超音波処理、フレンチプレス処理、アルミナ磨砕、溶菌酵素処理、界面活性剤または有機溶媒処理などで得た菌体あるいは酵素を含む菌体破砕物をいう。また公知の方法で精製して得られる酵素または公知の方法で固定化した菌体または酵素も用いることが出来る。

本発明方法は、原料化合物と上記の微生物またはその処理物とを接触させて行なわれる。反応液中の原料化合物の濃度は1～5%が適当である。反応温度は20～45℃、pHは5～8が適当であるが、特に温度は24～30℃、初発pHは6.5～7.5が良好である。反応時間は分解反応液に加える上記の微生物の発育状態および菌体量によっても異なるが、24～200時間、さらに好ましくは48～100時間

が適当である。また反応は静止下でも振とう、通気またはかくはんの条件下でもよいが、振とう、通気またはかくはんする方が良好である。反応液中には、所望により反応促進剤、酵素安定化剤、防腐剤（ペニシリン系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質等）などを添加してもよい。

反応液中から目的物を採取するには、通常微生物代謝物を採取するのに用いられる手段が単独あるいは任意の順序に組み合わせて、または反復して用いられる。すなわち、例えば、濾過、遠心分離、濃縮、乾燥、凍結乾燥、吸着、脱着、各種溶媒に対する溶解度の差を利用する方法（例えば、沈澱、結晶化、再結晶等）、クロマトグラフィーなどが用いられる。またバリエナミンが水に可溶で一般の有機溶媒に難溶な塩基性物質であることを利用して、いわゆる水溶性塩基性物質の単離精製に用いられる方法、例えばイオン交換樹脂、活性炭、ハイポーラスポリマー、セフアデックス、セフアデックスイオン交換体、セルローズ、イオン交換セルローズ、シリカゲル、アルミナ等を用いるクロマトグラフィーや吸脱着法が有利に用いられる。

次に実施例を挙げて本発明を説明する。

#### 実施例 1

フラボバクテリウム サツカロフィラムNa121株 (IFO 13984) をバリダマイシンA1%、硫酸アンモニウム1%、リン酸一水素カリウム0.7%、リン酸二水素カリウム0.3%、硫酸マグネシウム0.01% (pH7.1) を含有する培地2ℓに接種し、27℃で4日間振盪培養を行なった。得られた培養液を遠心分離により菌体を除いて上清を得る。この上清をアンバーライトIRC-50(アンモニウム型、500ml) カラムに通してバリエナミンを吸着させ、水洗後0.5Nアンモニア水でこれを溶出する。溶出液を減圧濃縮し、さらにダウエックス1×2(OH<sup>-</sup>型、500ml) カラムに通し、つづいて水で溶出する。ニンヒドリン陽性区分を分取し、減圧濃縮乾固する。80%エタノール水より結晶化して無色針状晶のバリエナミン3.5gを得る。

#### 実施例 2

2ℓ坂口フラスコ中、トリブチカーゼ (Trypticase<sup>®</sup>, BBL社製) 15gを水500mlに溶

解し、滅菌後フラボバクテリウム サツカロフィラムNa121株を接種し、28℃で24時間振盪培養する。

この培養液を50ℓ醗酵槽中の硫酸アンモニウム300g、リン酸一水素カリウム210g、リン酸二水素カリウム90g、硫酸マグネシウム3gの水溶液(30ℓ)にバリダマイシンA粗製物(バリダマイシンA約20%、バリダマイシンB約3%等を含む精製中間体)3kgを溶解し、消泡剤を加え、滅菌した液に加える。

反応液をpH7.1に調節し、4日間、通気下に攪拌する。

上記の反応液の20ℓを遠心分離し、上澄液をアンバーライトIRC-50(NH<sup>+</sup>型)のカラム(10ℓ)に通過吸着させ、カラムを水洗後、0.5Nアンモニア水で溶出し、溶出画分を減圧濃縮する。残留物をダウエックス1×2(OH<sup>-</sup>型)のカラムクロマトグラフィーに付しカラムを水で溶出する。バリエナミン溶出区分を減圧濃縮し、濃縮液にアセトンを加えて結晶化する。収量55.5g。

#### 実施例 3

坂口フラスコ中、トリブチカーゼ15gを水500ccに溶解し、滅菌後、フラボバクテリウム・サツカロフィラムNa121株を接種し、27℃で24時間振盪培養する。培養液を遠心分離して菌体を集め、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で一回洗浄して湿菌体約25gを得る。この菌体をバリドキシルアミンA(5.0g)の0.1Mリン酸緩衝液溶液(pH7.0、3ℓ)に加え、振盪下27℃で72時間反応を行ない、反応液を遠心分離して菌体を除去する。得られた上澄液を実施例1と同様の方法で処理してバリエナミン1.0gを得る。

#### 実施例 4

硫酸アンモニウム1%、リン酸一水素カリウム0.7%、リン酸二水素カリウム0.3%、硫酸マグネシウム0.01%を含む水溶液(100ml)にバリダマイシンEおよびFの混合物(約3:2の混合物)1.0gを溶解し(pH7.1)、フラボバクテリウム・サツカロフィラムNa121株を接種し、27℃で4日間振盪培養を行なう。培養液を遠心分離により菌体を除き、上澄液を実施例1と同様の方法で処理してバリエナミン0.11gを得る。